

遺伝子診断の現状

Current Status of Genetic Diagnosis

木戸 隆宏

Takahiro KIDO

抄 録

ワトソンとクリックのDNA（デオキシリボ核酸）の構造決定以来、遺伝子工学と呼ばれる核酸の構造・機能解析の研究は著しい進歩を遂げてきた。それを利用することによって、遺伝子を材料とした検査もまた、今や臨床検査の分野でひとつの柱となりつつある。遺伝子診断・検査における技術の高感度化、迅速化は、検体の微量化や検体処理能力の上昇さらに被検者の負担の軽減に役立っている。現在の遺伝子検査は、感染症などの外因性病因のみならず、遺伝子病など内因性病因でも行われている。しかし、この検査には、被検者やその家族のプライバシー侵犯の問題が常に伴う。遺伝差別を生じさせないためにも、ガイドラインや情報管理の充実のみならず、社会全体のしっかりとした議論が必要である。

キーワード ■ 遺伝子検査 遺伝病 外因性病因 内因性病因 遺伝差別

はじめに

臨床検査は、診断・治療を行う上での情報源として非常に重要である。侵襲性検査（被検者の血液・体液を用いた検査）法においては、被検者の負担を軽減するため検体採取量の微量化、データを早く得るための迅速化、また結果の解釈を円滑にするための特異性の向上など様々な面において、近年著しい進歩が認められている。その中で、遺伝子検査は上記の条件を満足できる重要な検査法として用いられてきている。ヒトの遺伝子配列を明らかにしようとするゲノムプロジェクトをはじめとする遺伝子科学の進歩は、遺伝子検査学に大きな影響を与え、感染症による病因遺伝子の検出や単一遺伝子の検査だけでなく、ゲノムにおけるすべての遺伝子の機能と相互作用が対象となってきた。これらのことから、専門職のみならず、医療従事者全体あるいは、一般の人たちの間でも遺伝子検査を身近なものになりつつある。本稿では、基本的な事柄も含めて現在の遺伝子診断、特に遺伝子検査について概説する。

1. 遺伝子とは

遺伝子という言葉は遺伝情報を担う物質として最近非常に耳にすることが多い。染色体、DNA (RNA) という言葉も同様である。これらはすべて遺伝に関わる物質である。これらの関係について整理してみる。

1) 染色体 (Chromosome)

染色体は細胞の核内に存在し、分裂中の細胞を光学顕微鏡で観察すると、ひも状あるいは棒状の構造が観察される。ヒトでの染色体数は46本であり、相同染色体が2本ずつ22種類(常染色体と呼ばれる)と女性ではXX, 男性ではXYという性染色体をもつ。

2) DNA (Deoxyribonucleic acid) (図1)

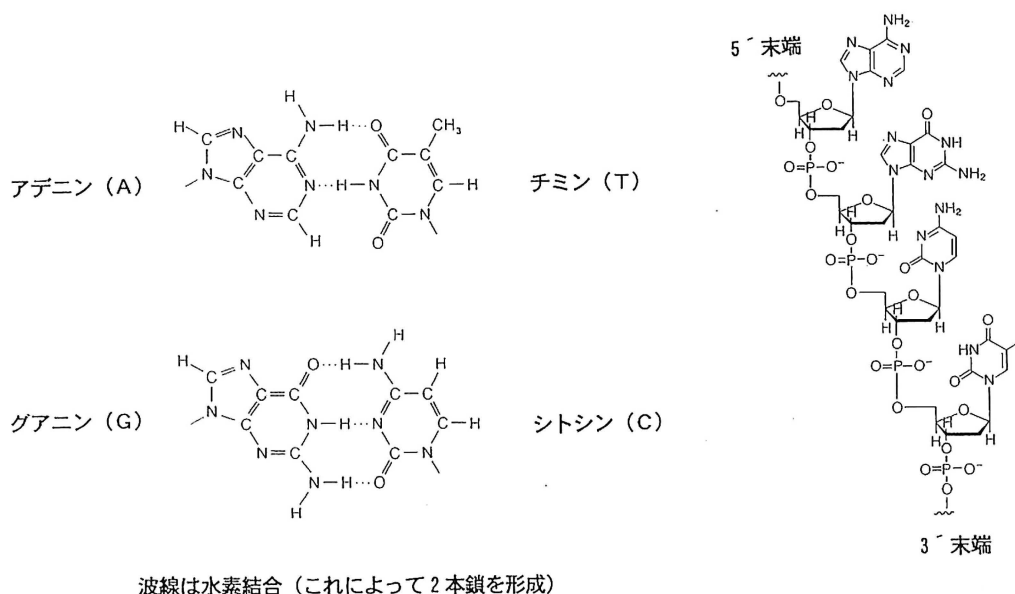


図1 DNAの構成塩基と結合様式

染色体は、DNA と呼ばれるひも状の高分子がヒストンというタンパク質を芯にして密に巻きつけられたクロマチン構造をとっている。DNA は、4 種の塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン)、五炭糖であるリボースおよびリン酸から構成される。各々の DNA のリボースの水酸基とリン酸基との間でのホスホジエステル結合によって高分子 DNA が作られる。その構造は1953年にワトソンとクリックによって明らかにされた¹⁾²⁾。また DNA は、特異的にアデニンとチミン、グアニンとシトシンがそれぞれ水素結合することでらせん状の二本鎖を形成している。この水素結合がほどけて新たに相補的な核酸が結合していくことで親 DNA と同じ核酸配列を持つ娘 DNA が形成される。これによって親のもつ情報が子に伝えられてい

くことになる。ヒトでは DNA は約 3.0×10^{10} 個の単分子 DNA が特定の順序で並んでいる。

3) 遺伝子 (Gene)

高分子 DNA は、莫大な長さを持っているが、このすべてが遺伝情報を担っているわけではない。この遺伝情報は、DNA→RNA (Ribonucleic acid: DNA の塩基のチミンがウラシルへ、リボースがデオキシリボースに変換しているもの) →タンパク質へ伝えられる。この情報伝達は、セントラルドグマと呼ばれる。DNA の配列の中で情報が伝達される領域をエクソン、そうでない部分をイントロンと呼んでいる (図 2)。DNA の中でこの遺伝情報を担っている領域を遺伝子と呼ぶ。遺伝情報が RNA に移っていく過程でスプライシングというエクソン領域の切断、再結合が行われた結果、必要なタンパク質が合成される。

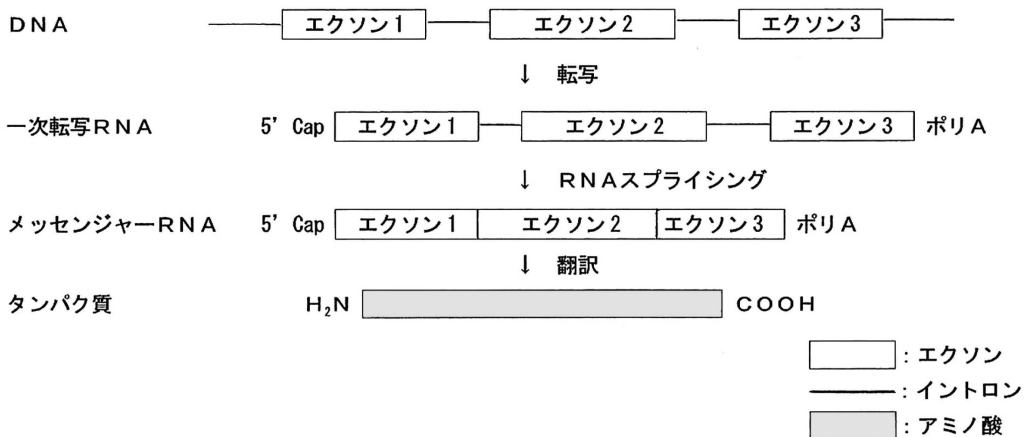


図 2 遺伝情報の流れ

2. 遺伝子検査技術

遺伝情報を担う DNA の解析は、核酸配列の決定、遺伝子機能の解析という二つの面からアプローチできる。核酸配列の決定は、Maxam-Girbert 法³⁾あるいは Dideoxy 法⁴⁾によって行われる。近年、これらの方法を原理とした機器の自動化が著しく進み、先に述べたゲノムプロジェクトの達成期間の短縮にもつながった。酸・アルカリや熱に強いなど化学的に安定なこと、化学修飾が容易なこと、その塩基同士が特異的に再結合することなどの性質を DNA がもつことは、遺伝子解析技術を促進する大きな原動力となった。

遺伝子検査を行うためには、核酸を生体から抽出する必要がある。検査目的に応じて、血液、羊水、喀痰、組織など様々なものが生体材料として用いられる。最近では、抽出のための簡便なキットが各社から発売されている。抽出された高分子核酸は、体表面、毛髪、唾液ある

いは空気中に存在する核酸分解酵素の影響を受けやすいため、抽出後の取り扱いには注意を要する。

次に核酸解析技術としてよく用いられているものについて示す。

1) プローブ法

DNA (RNA) が塩基の相補性に応じて 2 本鎖を形成することを利用して目的遺伝子を検出する方法である。プローブとは、検出目的 DNA (あるいは RNA) と相補性をもつオリゴヌクレオチド (単分子 DNA が数十から百前後繋がったもの) を標識したものを呼ぶ。標識は³²P や³⁵S といった放射性同位元素を以前は用いていたが、近年取り扱いが容易で、使用にあたって特別な施設を必要としない非放射性同位元素が用いられるようになっている (表 1)。

表 1 非放射性同位元素によるプローブ標識

標識物質	標識法	検出用物質	検出シグナル
ビオチン	光化学的架橋	酵素標識アビジン	発色
ジゴキシゲニン	末端ラベル	酵素標識抗体	化学発光
FITC	ニクトランスレーション	ペルオキシダーゼ	蛍光
スルホン基	化学的付加・架橋	アルカリフォスターゼ	
ペルオキシダーゼ	オリゴヌクレオチド合成		

(1) サザン (ノザン) プロット法⁵⁾ (図 3)

本法はプローブ法の代表的なものであり、遺伝子解析の初期から非常によく用いられた。検出目的の核酸が DNA のときサザン、RNA のときノザンと呼ぶ。その手順は検出目的 DNA を制限酵素 (Restriction enzyme: DNA の特定の塩基配列を認識して切断する酵素) によって消化し、アガロース電気泳動によって切断された DNA の長さ (塩基長と呼ぶ) に応じて分画する。これをナイロン膜 (以前はニトロセルロース膜がよく用いられていた) に毛細管現象あるいは電氣的に転写する。膜上の 2 本鎖 DNA をアルカリによる変性で 1 本鎖にした後、標的 DNA と相補性をもつプローブとの間でハイブリッドを形成させる (ハイブリダイゼーション)。膜を洗浄後、プローブの標識に応じて、オートラジオグラフィや発色、化学発光などでハイブリッドを形成した DNA 断片を検出する。ノザンプロット法による RNA の検出も基本的には同じであるが、RNA は元来 1 本鎖のため複雑な高次構造をとっており、電気泳動で鎖の長さに応じた移動度を示さない。そのため、電気泳動をするときにホルマリンなど変性剤を加える。サザンプロット法は、病因遺伝子の変異や欠失の解析、感染症による病原微生物・ウイルスの検出、制限酵素断片長多型 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) を用いたリンカージ (連鎖) 解析などに、ノザンプロット法はメッセンジャー RNA のサイズや発現量の検出に有用であった。しかし、操作の煩雑さや検出までの時間がかかるという欠点から、原理を残したまま様々な変法や改良法が開発されている。

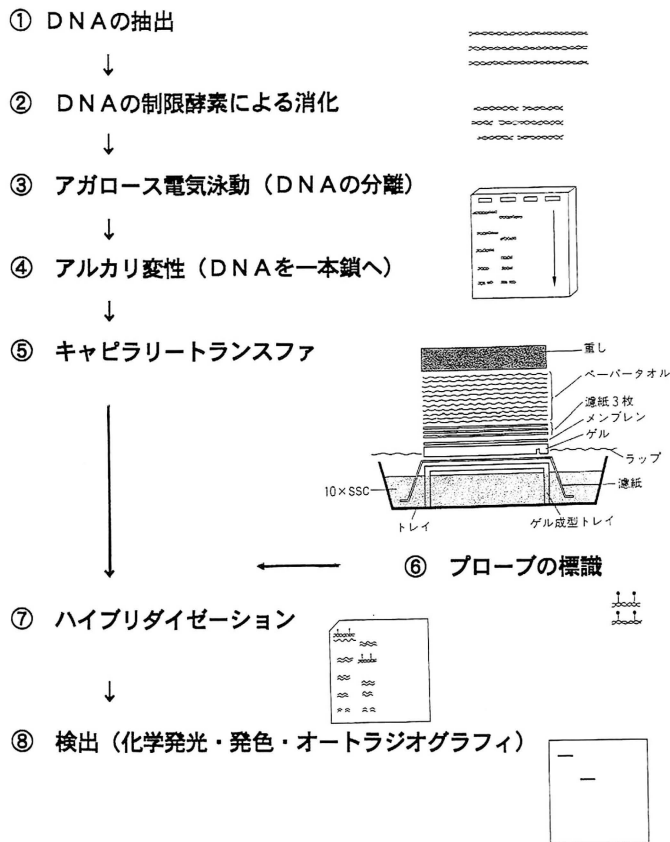


図3 サザンブロット法

(2) マイクロアレイ法⁶⁾

従来、サンプルのDNA（あるいはRNA）を直接、膜やプレートなどの支持体に吸着させた後、プローブとハイブリダイズさせる方法は、ドットブロット法と呼ばれ、病原性微生物などの外来遺伝子の検出やRNA発現量の解析に用いられている。近年、マイクロアレイ法と呼ばれる手技が非常に多く用いられるようになってきた（DNAチップ法と呼ばれることもある）。マイクロアレイ法は、プローブとして高濃度のオリゴヌクレオチドをスライドガラスや膜などの上に固定し、試料とハイブリダイズさせるものである。オリゴヌクレオチドプローブは μm 単位の間隔で固定することができるため、多数の異なる種類のプローブをわずかな単一表面上に固定することができる。検出は試料を蛍光標識したものが用いられる。蛍光色素を複数使用し、チップ表面を蛍光スキャナーでスキャンすることで一度に多くの結果を得ることができる。現在、後述するPCR増幅産物が主に試料となっている。本法はその特性を生かして配列解析、多型解析や染色体解析などに広く利用されている。

(3) *in situ* ハイブリダイゼーション法⁷⁾

本法はスライドガラス上に固定された組織片や細胞中の DNA (RNA) と標識プローブを直接ハイブリダイズさせる方法である。FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法は蛍光標識したプローブを用いる方法で、操作も簡便で蛍光顕微鏡下で比較的高感度に観察することができる。ウイルスなどによる感染細胞の確認、組織・細胞での mRNA 発現の検索、染色体の数的異常あるいは構造異常の解析に応用されている。高感度化をより進めるために本法と核酸増幅法を組み合わせた *in situ* PCR 法⁸⁾ も開発されている。

2) 核酸増幅法

(1) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

核酸増幅法とは、微量の DNA (あるいは RNA) から特定領域の核酸配列のコピーを多量に

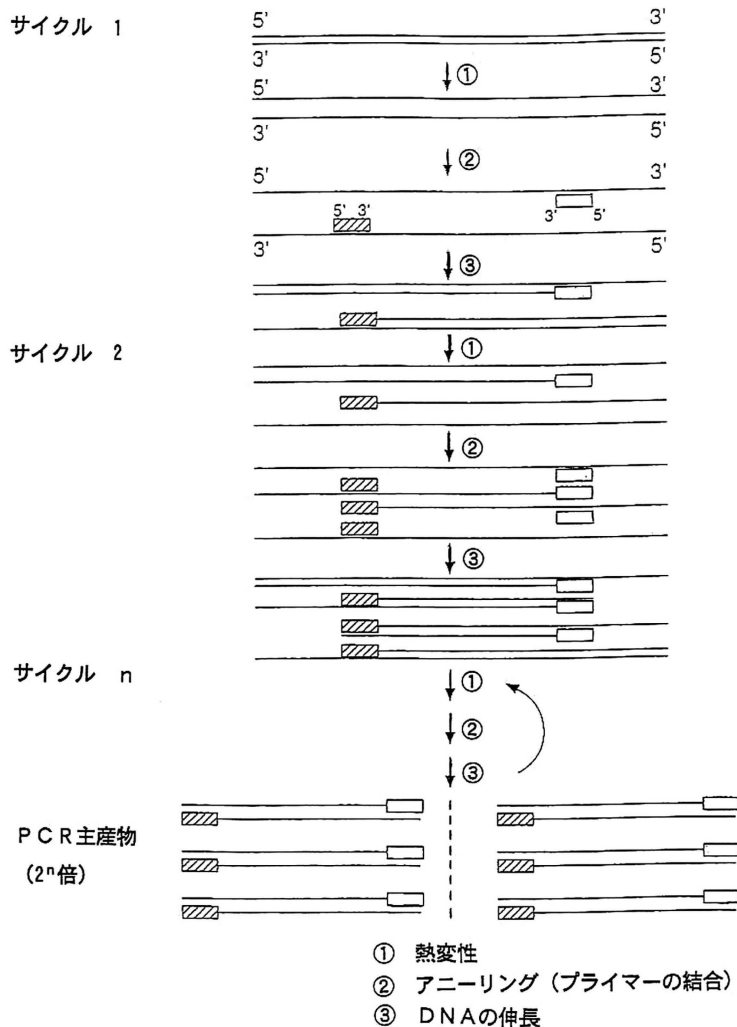


図4 PCRの原理

作成する方法である。代表例は、Mullis らによって開発された PCR 法である⁹⁾。本法の原理を図 4 に示す。PCR 法は温度変化によって二本鎖 DNA 間の水素結合を切断、プライマー（標的核酸領域と相補性をもつ 20～30 個の核酸が繋がったもの）の結合、そしてプライマーによって決められた位置からの熱耐性 DNA 合成酵素の反応による複製という 3 段階を繰り返すという極めてシンプルな系である。PCR 法による DNA の増幅は数億倍に及ぶので、試料が極めて微量で済む。本法は遺伝子研究の発展を飛躍的に発展させた。遺伝子の特定領域の検出法にとどまらず、先に述べたゲノムプロジェクトにおける DNA シーケンスを始めとして、点突然変異の検出（PCR-SSCP：PCR-Single Strand Conformation Polymorphism）など他の遺伝子解析法に応用されている。

感染症の遺伝子検査をおこなう場合、目的遺伝子の定量測定は重要である。そこで PCR を基本にした様々な方法が報告されているが、ここでは筆者らが検討した IM-PCR（Intercalation Monitoring-PCR）法¹⁰⁾を例に示す。IM-PCR 法は標的 DNA を PCR によって増幅する際に反応液中に PCR に必要な試薬とともに DNA の 2 本鎖に挿入される性質をもつ蛍光性色素（インターカレーター）をあらかじめ加えておき、PCR における伸長反応のサイクル毎に蛍光強度を測定するものである。インターカレーターは 2 本鎖 DNA に挿入されたときのみ蛍光を発するので、蛍光強度は増幅された DNA 量に応じて強くなる。本法は反応中に増幅 DNA をモニターでき、迅速な検出にも適している。また、コピー数（遺伝子の数）が既知の DNA を用い、それらが一定の蛍光強度に達するまでに必要な PCR のサイクル数とそのコピー数をプロットした検量線から DNA の定量測定が容易に行える。筆者らは、本法を用いて院内感染で問題となっている MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の迅速判定や、本法と RNA から DNA を合成する RT（Reverse transcriptase：逆転写酵素）反応を組み合わせ HCV（ヒト C 型肝炎ウイルス）の定量測定を行い、満足すべき結果を得ている。

（2）他の核酸増幅法

PCR 法は核酸増幅のための主たる方法として用いられてきた。最近、他の種々の核酸増幅法が開発されてきている（表 2）。対象となる核酸は DNA だけではなく RNA を用いる場合もある。増幅の原理は、いくつかの核酸関連酵素や複数のプライマーを使って一定温度で増幅するというものであり、感度や特異性に優れたものが多い。

3. 遺伝子検査の対象¹¹⁾

検査対象は、外因性病因、内因性病因と個人・細胞マーカーに分けられる（表 3）。外因性病因は感染性病原体（細菌・ウイルス）のゲノムやそれが持つ毒素、薬剤耐性の遺伝子がある。内因性病因としては癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常解析、また、単一（または複合）遺伝子病の病因あるいは素因遺伝子の解析が含まれる。個人・細胞マーカーは核酸の繰り返し配列

表2 PCR 以外の核酸増幅法

方法	対象核酸	特徴
LCR	DNA	核酸連結反応を利用 増幅の特異性が高い
ICAN	DNA	恒温反応 反応中、DNA 間の相互作用がない
LAMP	DNA	恒温反応 増幅産物が大量に生産される
NASBA	RNA	恒温反応 RNA から直接増幅される
PALSAR	DNA・RNA	シグナル増幅 酵素を使わずプローブのみで自己集合体を形成
TRC	RNA	恒温反応 発蛍光プローブを使用し特異性が高い
SDA	DNA	恒温反応 同じに複数のターゲットを増幅可能

表3 遺伝子検査の対象

外因性病因	感染症	ウイルス、細菌、毒素、耐性因子
内因性病因	遺伝病	単一遺伝子、複合遺伝子、遺伝子因
	腫瘍	造血器腫瘍（白血病） 固形腫瘍（癌遺伝子、癌抑制遺伝子）
個人・細胞マーカー	個人識別	法医学
	移植	ヒト白血球抗原

を利用した個体の識別、輸血や移植検査の領域での HLA（human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原）の解析などがある。

1) 外因性病因

外因性病因である感染症の遺伝子検査の中で、結核菌、クラミジア、淋菌、MRSA などの細菌や B 型及び C 型肝炎ウイルス、HIV-1（ヒト免疫ウイルスタイプ-1）などが保健適用を受けている。従来、感染の検査は、培養操作で増菌後、光学顕微鏡を用いた塗抹標本解析や生化学試験によって同定していたことから、検査結果を得るまでにかなりの時間を必要とした。現在では、核酸検出法の高感度化によって検査結果の迅速化は非常に進んでいる。また、数多くの細菌のゲノムの塩基配列が明らかになることによって、遺伝子レベルでの細菌の分類も積極的に進んでいる。ゲノムの塩基配列から作成したプローブを利用することにより、同時に複数の菌を同定することも可能になってきている。また、定量法の進歩は、C 型肝炎ウイルス感染のインターフェロン投与における効果確認をはじめとして感染症の治療効果判定に貢献してきている。近年、敗血症診断のために、血液中に侵入した病原細菌が好中球あるいはマクロファージに貪食された後の菌体構成成分の検出に *in situ* ハイブリダイゼーション法を利用す

る方法も開発されている¹²⁾。

2) 内因性病因

(1) 遺伝子病

一つの遺伝子の異常により発症することが規定される単一遺伝子病は数千種類あると言われている。単一遺伝子病はメンデルの遺伝様式に従い、常染色体優性、常染色体劣性、X連鎖優性、X連鎖劣性、Y連鎖に分類できる。遺伝子検査の対象となるのは、先天性代謝異常症などでの責任遺伝子が同定されているものである。遺伝子の変異は、点突然変異、数塩基の欠失・挿入、遺伝子置換、3塩基反復配列数の変化として認められる。一方、複合遺伝子や環境的要因が疾患に関係する多因子病はメンデル型の遺伝様式に従わない。これらには生活習慣病、精神疾患、口蓋裂や心奇形などの先天奇形などがある。

(2) 造血器腫瘍

造血器腫瘍は後天的に造血細胞の遺伝子に変異を起こし、細胞が異常増殖することによりおこる。急性白血病の治療は白血病細胞がどの程度存在するかで判定される。従来行われてきた形態学的検査法やフローサイトメトリー法は微量残存病変を検出するには感度が不十分であった。転座型白血病に特異的な BCR-ABL キメラ遺伝子の再構成を調べる方法は、その感度が従来の検査法の1000倍を有するため、非常に有効である¹³⁾。高感度を得るために、BCR-ABL mRNA を標的核酸とし、逆転写反応後、PCR によって DNA を増幅し検出する。また定量的 PCR 法も併せて用いられてきている。

(3) 癌関連遺伝子(癌遺伝子・癌抑制遺伝子)

これらの遺伝子はそれぞれ数十種類あるといわれている。正常細胞中でもこれらの遺伝子がコードするタンパク質は発現している。一般に癌遺伝子から発現したタンパク質は細胞増殖に、癌抑制遺伝子から発現したタンパク質は増殖を抑制する働きをもつ。細胞の癌化は1つの遺伝子の異常で引き起こされるのではなく、環境因子を含め多段階で病態を引き起こすと考えられる(図5)。癌関連遺伝子の異常は点突然変異、欠失・挿入及び遺伝子プロモーターの異常による DNA の過剰発現がある。癌関連遺伝子の異常は PCR 法によって対象領域を増幅後、SSCP 電気泳動法で塩基配列の違いの範囲を絞って核酸配列を決定する。

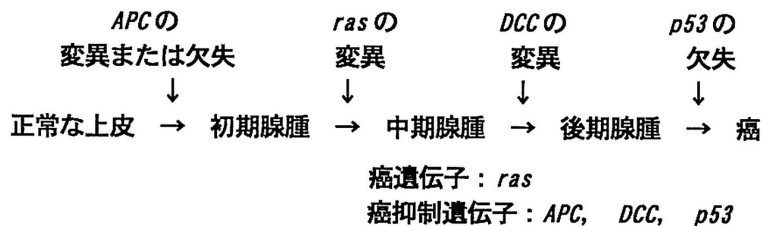


図5 大腸癌の発ガンモデル¹⁴⁾

4. 今後の遺伝子検査

遺伝子を用いる検査は、その解析技術の飛躍的な進歩によって、臨床検査の中で今後も重要な位置を占めていくと考えられる。その中で、将来検討が必要となることをいくつかあげる。核酸解析技術は、研究レベルとして、標的核酸領域の検出からスタートした。その後、放射性同位元素を用いない検出系の開発や PCR 法の確立は遺伝子検査の一般化に大きく貢献した。また、様々な測定キットの開発によって短時間に多くのサンプルが処理できるようにもなった。さらに、近年では数々の遺伝子の定量測定が開発されてきている。しかし検出感度の高感度化、検体処理能力の上昇は、常にコンタミネーションによる偽陽性の危険が伴う。さらに、検査を行う施設によるデータの乖離を引き起こす原因となりうる。検査技術の標準化の確立は、遺伝子検査の精度を保障し、その発展・普及に必須である。技術の標準化を進める一方、得られたデータが診断に役立ち、診療予防に有用であることが保障されなければならない。遺伝子診断における臨床的妥当性・有用性の保障は、EBGT (evidence -based genetic testing) と呼ばれる科学的根拠に基づいた手法で検証される必要がある¹⁵⁾。しかし、現在のところ、EBGT の分析に耐える報告データは乏しいと指摘されている。遺伝子診断の普及が著しい現在、検査法、データ解析についての標準化の確立が早急に求められる。

5. 遺伝子検査と倫理

従来の検査は、病態検査、すなわち生体内の物質の量的、質的变化を測定しその異常を判断する検査であった。一方、遺伝子検査は、その変化の原因となる遺伝子を定性あるいは定量的に検査する、病因検査である。遺伝子を検査することは、各個人のもつ情報を理論的にはすべて知りうることとなる。それゆえ、常にプライバシー侵犯の問題が存在する。また、病因検査の特性から、発症前診断や出生前診断が可能であり、それが遺伝差別と呼ぶべき新たな差別を生む要因となっている。遺伝子解析に関して、UNESCO のヒト遺伝情報に関する国際宣言¹⁶⁾をはじめ厚生労働省¹⁷⁾、遺伝関連学会等がガイドライン¹⁸⁾を提示している。現在、大学病院を中心に遺伝子医療部門が開設され、遺伝カウンセリングが実施されている。しかし、遺伝子診断における倫理問題は、実施者のみの問題ではなく、被検者及びその家族も含んだ非常にデリケートな生命倫理の問題である。ポストゲノムの時代に入ったと言われる今、さらなる議論の充実が期待される。

おわりに

遺伝子検査は著しい進歩をあげており、その対象も多岐にわたってきている。本稿では、基本的な事項を中心に概説した。ここでは触れなかったが、遺伝子診療のもうひとつの柱である遺伝子治療についても研究・臨床応用が進んでいる。遺伝子治療や移植医療、再生医療といった高度先端医療が進んでいく中、ともすれば医療倫理が置き去りにされがちである。医療関係者だけでなくすべての人たちが、これらの情報にふれ、医療倫理の議論に積極的に参加することは重要である。

〔注〕

- 1) Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171 : 737-738
- 2) Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171 : 964-967
- 3) Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 560
- 4) Sanger F. et al. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463
- 5) Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517
- 6) Scheena, M. (1999) DNA microarrays : A practical approach (Practical approach series 205). Oxford Univ. Press.
- 7) 小路武彦 (編著) (1998) *In situ* hybridization の基礎と基本手技. 学際企画.
- 8) Nuovo, G. J. (1994) PCR *in situ* hybridization, Protocols and applications (2nd Ed.). Raven Press
- 9) Mullis, K. B. et al. (1986) Specific amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 51 : 263-273
- 10) Kido, T. et al. (1995) DNA quantification by a novel method, intercalating-monitoring polymerase chain reaction. (Quality Control in the Clinical Laboratory) Ohba, Y. , Kanno, T. , et. al. eds. , 323-328. *Excepta Medica*
- 11) 福島義光 (編) (2005) 遺伝子診療学. 日本臨牀社.
- 12) 松久明生他. (2001) 貪食細胞を用いたセプシスの *In situ* 分子診断. *細胞*, 33(7), 20-23.
- 13) Saglio, G. et al. (1996) Consistent amounts of acute leukemia-associated P190 BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood* 87 : 1075-1080
- 14) Fearon, E. R, Vogelstein, B. , (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759-767
- 15) 上田國寛 (2006) 動き出した遺伝子診断とEBGT. 日本遺伝子診療学会大会抄録. 24

- 16) UNESCO : http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyututl/shiryo/001/04010701.htm
- 17) 厚生労働省 (2004) 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取り扱いのためのガイドライン
- 18) 遺伝医学関連10学会 (2003) 遺伝学的検査に関するガイドライン

(きど たかひろ 作業療法学科)

2006年12月7日受理